

Process for the production of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*.

Patent number: EP0290768
Publication date: 1988-11-17
Inventor: EBELING WOLFGANG DR; HEILMANN HANS-JURGEN DR; MEINHARDT FRIEDHELM DR
Applicant: MERCK PATENT GMBH (DE)
Classification:
- international: C12N1/20; C12N1/21; C12N9/04; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/53; C12Q1/32; C12R1/11; C12R1/19; C12N1/20; C12N1/21; C12N9/04; C12N15/00; C12N15/09; C12N15/53; C12Q1/32; (IPC1-7): C07K7/10; C12N1/20; C12N9/04; C12N15/00; C12Q1/32
- european: C12N9/04
Application number: EP19880104952 19880328
Priority number(s): DE19873711881 19870408

Also published as:

US5126256 (A1)
 JP63269979 (A)
 EP0290768 (A3)
 DE3711881 (A1)
 EP0290768 (B1)

Cited documents:

EP0095950
 EP0285949

[Report a data error here](#)

Abstract of EP0290768

Polypeptides with the biological activity of the enzyme glucose dehydrogenase are prepared by genetic engineering using DNA sequences, recombinant DNA molecules and transformed host organisms.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

**0 290 768
A2**

②

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

① Anmeldenummer: 88104952.2

② Anmeldetag: 28.03.88

⑤ Int. Cl.: C12N 15/00 , C12N 1/20 ,
C12N 9/04 , C12Q 1/32 ,
C07K 7/10 , //(C12N1/20,
C12R1:19)

③ Priorität: 08.04.87 DE 3711881

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.11.88 Patentblatt 88/46

⑥ Benannte Vertragsstaaten:
CH DE ES FR GB IT LI NL SE

⑦ Anmelder: Merck Patent Gesellschaft mit
beschränkter Haftung
Frankfurter Strasse 250
D-6100 Darmstadt(DE)

⑧ Erfinder: Ebeling, Wolfgang, Dr.
Am Hintergraben 9
D-6101 Bickenbach(DE)
Erfinder: Hellmann, Hans-Jürgen, Dr.
Schöneweibergasse 91
D-6103 Griesheim(DE)
Erfinder: Meinhardt, Friedhelm, Dr.
Gross-Erckenschwickerstrasse 95
D-4353 Oer-Erckenschick(DE)

⑨ Verfahren zur Herstellung von Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium*.

⑩ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gentechnologischen Herstellung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucosedehydrogenase sowie neue DNA-Sequenzen, rekombinante DNA-Moleküle und transformierte Wirtsorganismen.

EP 0 290 768 A2

Xerox Copy Centre

Verfahren zur Herstellung von Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium*

Die Erfindung betrifft ein gentechnisches Verfahren zur Herstellung von Glucose-Dehydrogenase. Dabei wird aus einem kultivierten mikrobiellen Wirtsorganismus das Enzym Glucose-Dehydrogenase isoliert, nachdem der Wirt zuvor mit entsprechender rekombinanter DNA transformiert wurde. Die rekombinante DNA enthält eine Sequenz, die aus einem Genom vom *Bacillus megaterium* stammt und für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Glucose-Dehydrogenase codiert.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Bereitstellung einer DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase codiert.

Außerdem betrifft die Erfindung Klonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung bei der Herstellung eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase sowie mit solchen Vektoren transformierte Wirtsorganismen, beispielsweise Bakterien, Hefen, andere Pilze, tierische oder menschliche Zellen.

Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung der zur Expression gebrachten entsprechenden Polypeptide für die Bestimmung von Glucose. Der Ausdruck "Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase" bezeichnet ein Polypeptid bzw. Protein, dessen Aminosäure-Sequenz der nativen Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium*-Stämmen entspricht, ähnlich zu dieser Sequenz ist oder einen enzymatisch aktiven Teilbereich umfaßt. Analoges gilt auch für solche erfindungsgemäßen Polypeptide, in denen die native Sequenz nur einen Teilbereich darstellt.

NAD/NADP-abhängige Glucose-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.47) im folgenden Glucose-DH benannt, katalysiert die Umsetzung von β -Glucose zu Gluconolacton, wobei der Co-Faktor NAD zu NADH₂ reduziert wird. Das Enzym zeichnet sich durch hohe Substratspezifität in Bezug auf β -D-Glucose aus. Epimere Zucker werden nicht umgesetzt. Die Hauptanwendung des Enzyms liegt in der medizinischen Diagnostik. NAD-abhängige Glucose-DH kommt in einer Reihe von *Bacillus*-arten vor. Die Bildung dieses Enzyms unterliegt einer entwicklungsphysiologischen Steuerung, d.h. es wird nur während einer kurzen Phase der Sporulation synthetisiert. Zudem ist Glucose-DH in den meisten Fällen mit NADH₂-Oxidasen vergesellschaftet, welche die Bestimmung von Glucose nach der o.g. Glucose-DH-Methode empfindlich stören und sich zudem nur schwer entfernen lassen. Dies alles hat zur Folge, daß die Ausbeuten an Enzym mittels üblicher klassischer Methoden und unter Verwendung von *Bacillus*-Wildstämmen sehr bescheiden sind (0,01 bis max. 0,1 Units/ml Kultur). Mit Hilfe bekannter Stammverbesserungs-Methoden lassen sich Stämme selektieren, bei denen eine Glucose-DH-Bildung auch unabhängig von der Sporulationsphase feststellbar ist (durchschnittliche Enzymaktivitäten 1 bis 10 Units/ml Kultur), jedoch können solche "entkoppelten" Stämme leicht revertieren, d.h. zum ursprünglichen Sporulationsverhalten zurückkehren, so daß ein steter und oftmals langwieriger Aufwand betrieben werden muß, um Sporen- und Glucose-DH-Bildung voneinander getrennt zu halten. Zwar gelang es kürzlich (Vasantha et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Science, USA, Vol. 80, 785-789) ein Glucose-DH codierendes Gen einschließlich seines Promotors aus *Bacillus subtilis* zu isolieren und in *E. coli* sporulationsunabhängig zur Expression zu bringen, jedoch erwies sich dieses Enzym im Gegensatz zu der im Handel erhältlichen Glucose-DH überraschenderweise als recht instabil (Ramaley, Vasantha 1983, J. Biol. Chem., Vol. 258, 20, 12558-12565). Hohe Enzymstabilität ist aber gerade erforderlich, um einen schnellen und reproduzierbaren Glucose-Bestimmungstest durchführen zu können.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein gentechnologisches Verfahren bereitzustellen, das die technische Herstellung einer stabilen Glucose-Dehydrogenase in großen Mengen und in verbesserter Qualität ermöglicht. Diese Aufgabe wurde wie nachstehend angegeben gelöst.

Überraschend wurde gefunden, daß durch Anlegen einer Genbank von *Bacillus megaterium* in einem Phagenvektor, vorzugsweise λ -EMBL-3, sukzessive Verkleinerung des das Strukturgen tragenden DNA-Bereichs und jeweilige Transformation eines Wirtsorganismus, insbesondere *E. coli*, mindestens zwei unterschiedliche Strukturgene getrennt erhalten werden können, die letztlich zur Expression von mindestens zwei unterschiedlichen Glucose-DH-Isoenzymen in verbesserter Qualität und Quantität führen.

Während der eine identifizierte Glucose-DH codierende, 2100 Basenpaare (bp) große DNA-Bereich in DNA- und Aminosäuresequenz der bekannten Sequenz von käuflicher Glucose-DH voll entspricht (Jany et al., 1984, FEBS Lett. 165; 6-10), enthält das andere 1100 bp große DNA-Fragment die in Figur 1 dargestellte neue Sequenz. Die davon abgeleitete und durch Proteinsequenzierung des aufgereinigten Enzyms bestätigte neue Aminosäuresequenz ist in Figur 2 wiedergegeben. Die Abweichung gegenüber der bekannten Sequenz beträgt fast 20 %. Die Unterschiede in den ersten 45 Aminosäuren sind in Figur 7 dargestellt. Baut man diese verschiedenen DNA-Fragmente in hierfür geeignete Plasmidvektoren (z. B. pJH111 und pJH211) ein und transformiert entsprechende Wirtsorganismen, vorzugsweise *E. coli*-Zellen, so erhält man allein durch einen in *E. coli* aktiven bacilluseigenen Promotor in beiden Fällen Glucose-DH-

Enzymaktivitäten von 0.05 bis 0.5 Units/ml Kultur, vorzugsweise 0.09 bis 0.2 Units/ml Kultur. Dies übertrifft die Werte, die nach klassischen Methoden für *Bacillus*-Wildstämme erreicht werden können, bereits mind. um den Faktor 5. Durch Einbau des bekannten regulierbaren λ -P_L-Promotors vor das jeweilige Strukturgen lassen sich überraschend hohe Enzymaktivitäten messen: 30-65 Units/ml Kultur, vorzugsweise 40-50
 5 Units/ml Kultur bei Verwendung des neuen Polypeptids gemäß Figur 2 bei *E. coli* N100/pRK248/pJH115, und 20-40 Units/ml Kultur, vorzugsweise 25-35 Units/ml Kultur bei Verwendung des Polypeptids der bekannten Sequenz bei *E. coli* N100/pRK248/pJH215. Diese Werte liegen ca. 500mal höher als die Glucose-DH-Ausbeute bei *Bacillus*-Wildstämmen und ca. 5-10mal höher als bei den aufwendig zu entwickelnden sporulationsentkoppelten *Bacillus*-Stämmen. Eine typische Wachstums- und Expressionskurve ist in
 10 Figur 8 exemplarisch für *E. coli* N100/pRK248/pJH115 wiedergegeben.

Neben der beträchtlichen Aktivitätssteigerung weist das erfindungsgemäße Verfahren aber auch noch weitere Vorteile auf. So entfallen alle Sporulationsprobleme in *E. coli*. Ein nach dem neuen Verfahren hergestellter Wirtstamm läßt sich somit wesentlich einfacher und wirtschaftlicher verwenden. Ferner zeigen die Rohextrakte der nach dem neuen Verfahren Glucose-DH-produzierenden *E. coli*-Wirtszellen keinerlei
 15 Pigmentierung (klare, farblose Flüssigkeit), während die Rohextrakte, hergestellt nach konventioneller Art, stark dunkelgrün bis schwarz gefärbt sind und einer weiteren Aufreinigung bedürfen. Ein nach dem neuen gentechnologischen Verfahren hergestellter Rohextrakt enthält ferner keine nennenswert störenden NADH₂-Oxidasen. Die Reinheit bezüglich Fremdproteingehalt ist aus Figur 9 abzulesen. Die die rekombinante DNA enthaltenden Wirtszellen weisen weiterhin eine erstaunlich hohe Plasmidstabilität auf; außerdem zeigen die
 20 jeweiligen Expressionsprodukte eine gute Enzymstabilität, die für diagnostische Zwecke gewährleistet sein muß. Hier ist ein weiterer deutlicher Vorteil gegenüber dem bekannten *Bacillus subtilis*/*E. coli*-System festzustellen.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist also entscheidende Vorteile gegenüber dem Stand der Technik auf.

25 Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von Glucose-DH durch Kultivierung eines mit rekombinanter DNA transformierten mikrobiellen Wirtsorganismus in einem Nährmedium und Isolierung der zur Expression gebrachten verschiedenen Polypeptide, das sich dadurch kennzeichnen läßt, daß ein Wirtsorganismus eingesetzt wird, der einen aus dem Genom von *Bacillus megaterium* isolierten DNA-Bereich enthält, welcher für ein bzw. mehrere Polypeptide mit der biologischen Aktivität des Enzyms
 30 Glucose-DH codiert.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls die DNA-Sequenz gemäß Figur 1, die für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucosedehydrogenase codiert.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem das Plasmid pJH111, welches die für das Glucose-DH-Polypeptid codierende erfindungsgemäße DNA-Sequenz enthält.

35 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein rekombinantes Expressionsplasmid, in dem der gesamte codierende Bereich des Glucose-DH-Gens unter Kontrolle des λ -P_L-Promotors steht und die gesamte DNA-Sequenz des Glucose-DH-Gens bestimmt. Erfindungsgemäß können anstelle des λ -P_L-Promotors als Expressions-Kontroll-Sequenz ebenso ein *E. coli* Promotor-System wie das *E. coli* lac-System, das *E. coli* Lactamase-System, das *E. coli* trp-System oder der *E. coli* Lipoprotein-Promotor, eine Hefeexpressions-
 40 Kontroll-Sequenz oder eine andere eukaryotische Expressions-Kontroll-Sequenz verwendet werden. Wichtig ist dabei nur die funktionelle Verknüpfung des Gens mit der Expressions-Kontroll-Sequenz sowie die Auswahl einer geeigneten Expressions-Kontroll-Sequenz für einen bestimmten Wirtsorganismus.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere das Expressionsplasmid pJH115, welches die für das Glucose-DH-Polypeptid codierende erfindungsgemäße DNA-Sequenz einschließlich des λ -P_L-Promotors
 45 enthält.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem das die biologische Aktivität der Glucose-DH aufweisende Polypeptid mit der in Figur 2 angegebenen Aminosäuresequenz, das bei der Expression unter den genannten Bedingungen synthetisiert werden kann. Gegenstand der Erfindung ist auch der die erfindungsgemäße DNA enthaltende Wirtsorganismus, insbesondere *E. coli* N100/pRK248/pJH115, in welchen das
 50 Plasmid pJH115 transformiert wurde.

Gegenstand der Erfindung ist letztlich die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids zur Glucose-, insbesondere Blutzuckerbestimmung.

Erfindungsgemäß kann unter Verwendung der isolierten Glucose-DH-codierenden DNA-Sequenz aus *Bacillus megaterium* als Sondenmolekül in Genbanken Glucose-DH bildender Mikroorganismen das entsprechende Gen identifiziert und aus diesen Genbanken isoliert werden. Auf diese Weise ist auch die
 55 Herstellung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-DH von anderen Mikroorganismen, z.B. *Bacillus subtilis*, in beliebiger Menge möglich.

Als Glucose-DH liefernde Spezies dienen Mikroorganismen der Art *Bacillus megaterium* sowie deren

Mutanten oder Varianten, welche die entsprechende genetische Information besitzen. Stämme dieser Art sind bekannt und bei autorisierten Hinterlegungsstellen hinterlegt, z.B. DSM 321, DSM 322, DSM 333 oder DSM 337.

Als Wirtsorganismen, die mit Glucose-DH codierende DNA transformiert werden können, kommen in erster Linie Mikroorganismen, aber auch pflanzliche, tierische oder menschliche Zellen in Betracht. Vorzugsweise werden aber Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und andere Pilze, insbesondere *E. coli*-Bakterien, eingesetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt wie folgt durchgeführt.

Zunächst wird chromosomale DNA aus *Bacillus megaterium*-Zellen (Anzucht siehe Beispiel 1), mit Hilfe literaturbekannter Methodik isoliert und aufgereinigt (Beispiel 4). Die chromosomale aus *Bacillus megaterium* isolierte DNA wird mit Hilfe von hierfür geeigneten üblichen und bekannten, in der Regel käuflichen Restriktionsendonucleasen in an sich bekannter Weise partiell hydrolysiert. Vorzugsweise wird hierfür das Restriktionsenzym *Sau3A* eingesetzt. Die Hydrolyse wird so gesteuert, daß hauptsächlich Fragmente mit einer Länge zwischen 9 und 22 Kilobasen (kb), vorzugsweise mehr als 14 kb erhalten werden, da diese sich besonders vorteilhaft zum Einbau in die DNA eines Phagenvektors eignen. Ziel ist es, zur Klonierung des Strukturgens der Glucose-DH eine Genbank des entsprechenden *Bacillus*-Stammes mit Hilfe eines geeigneten Phagenvektors anzulegen. Hierfür dient vorzugsweise der bekannte Phagenvektor λ -EMBL3 (Frischauff et al., 1983, J. Mol. Biol. 170, 827-842). Die DNA des Phagen wird wie in Beispiel 3 näher beschrieben, präpariert und nach bekannter Weise mittels üblicher Restriktionsendonucleasen, vorzugsweise *Bam*HI, aufgeschnitten. Die Größe der jeweilig erhaltenen DNA-Fragmente wird mittels Gelelektrophorese bestimmt.

In die Schnittstelle der Phagen-DNA werden nun die passenden DNA-Fragmente aus dem *Bacillus*-Genom mittels käuflicher Ligierungsenzyme, vorzugsweise *T₄*-DNA-Ligase, in an sich bekannter Weise eingebaut (Beispiel 5). Die so erhaltenen verschiedenen neukombinierten Phagen-Moleküle werden in einem zu ihrer Vermehrung befähigten Wirtsorganismus, vorzugsweise *E. coli*, insbesondere *E. coli* NM539- (Sup F hsd R lac Y P₂COx3) (ATCC 35 639) transduziert und in bekannter Weise kloniert (Arber et al. 1983, in "Lambda II", Cold Spring Harbor Monographs, 433-465). Die Transformation von *E. coli*-Stämmen allgemein wird z.B. nach der Calciumchlorid-Methode vorgenommen und ist im Beispiel 6 näher erläutert. Die Identifizierung des Glucose-DH-Gens erfolgt durch Nachweis der Enzymaktivität im Lysat der neuentstandenen Phagenklone mit Hilfe eines spezifischen Filtertests auf Basis der eingangs beschriebenen Glucose-DH-Nachweisreaktion. Die Bildung von NADH₂, die mit der Glucose-DH-Bildung einhergeht (positive Reaktion), wird durch das Auftreten von Fluoreszenzsignalen der auf Filterpapier aufgetragenen durch Phagen lysierten Zellen (Plaques) nachgewiesen (Beispiel 9). Aufgrund dieser ggf. zu wiederholenden Tests, die auch in den folgenden Arbeitsschritten zur Anwendung kommen, können schließlich Phagenklone mit reproduzierbarer positiver Reaktion identifiziert werden. Zur Bestätigung des Ergebnisses wird Flüssiglysat des isolierten Klon spektralphotometrisch (334, 340 oder 385 nm HG) untersucht und die Substratspezifität getestet. Dabei werden die aus der Literatur bekannten Daten erhalten (Pauly et al., 1975; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356; 1613-1623).

Um eine Konzentrierung der Glucose-DH-DNA innerhalb der rekombinanten Phagen-DNA zu erreichen, erfolgt in einem weiteren Arbeitsgang die Subklonierung vorzugsweise in Plasmiden. Hierzu wird wiederum die rekombinante Phagen-DNA partiell mit Restriktionsendonucleasen, vorzugsweise *Sau3A*, wie üblich hydrolysiert, so daß Fragmente von etwa 4-9 kb Größe entstehen. Als Ausgangsplasmid kann im Prinzip jedes Plasmid verwendet werden, welches bei einem Einbau von DNA-Fragmenten der angegebenen Größe nicht destabilisiert wird. Besonders hierfür geeignet ist das bekannte Plasmid pBR322 (Herkunft: Bolivar et al., 1977, Gene 2, 95-113), welches vorzugsweise mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI anverdaut wird. Die Phagen-DNA-Fragmente werden nun in an sich bekannter Weise mit dem aufgeschnittenen Plasmidvektor ligiert (Beispiel 5). Mit den Ligierungsprodukten wird ein beliebiger, zur Transformation geeigneter und in einer anerkannten Hinterlegungsstelle erhältlicher Wirtsorganismus, vorzugsweise *E. coli* in üblicher Weise transformiert (Beispiel 6). Die so erhaltenen Kolonien werden dem Glucose-DH-Enzymtest (Beispiel 9) unterworfen. Dabei zeigen mehrere Klone eine positive Glucose-DH-Reaktion. Eines der zugrundeliegende Plasmide besitzt eine Größe von 10.2 kb und wird mit pJH 107 bezeichnet. Zum Zwecke der Restriktionsanalyse wird das Plasmid in an sich bekannter Weise durch die Restriktionsendonucleasen *Eco*RI, *Sall*, *Sph*I, *Hind*III und *Cla*I vollständig hydrolysiert, und die DNA-Fragmente werden mittels einer Agarosegelelektrophorese in an sich bekannter Weise aufgetrennt. Die Größe des Passagier-Fragmentes, welches die Glucose-DH-Sequenz enthält, wird mit 5800 bp ermittelt. Figur 3 gibt die Restriktionskarte des erfindungsgemäßen Plasmids pJH107 wieder.

Zur weiteren Eingrenzung des Gens auf dem rekombinanten Plasmid wird in folgender Weise vorgegangen, wobei die Verfahrensweise oben und in den Beispielen beschrieben oder allgemeiner Stand der Technik ist.

- Verdauung von pJH107 mit Restriktionsendonucleasen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im Strukturgen schneiden. Vorzugsweise kommt hier SphI zum Einsatz.

- 5 - Einbau in den Plasmid-Vektor pBR322 und Transformation und Klonierung eines Wirtsorganismus, vorzugsweise E. coli RR1. Neukombinierter erfindungsgemäßer Plasmid-Vektor: pJH 108, enthält ein ca. 3000 bp großes Passagier-DNA-Fragment (Figur 4). Bei der Restriktionsanalyse werden vorzugsweise die Endonucleasen, SphI, ClaI, EcoRI und HindIII eingesetzt.

Verdauung von pJH108, vorzugsweise mit HindIII. Einbau in den Plasmid-Vektor pBR322 und Transformation und Klonierung eines Wirtes, vorzugsweise E. coli. Neukombinierter erfindungsgemäßer Plasmid-Vektor: pJH111 (Figur 5).

Der Plasmid-Vektor pJH111 enthält wie die Restriktionsanalyse zeigt, nur noch ein 1100 bp großes Passagier-DNA-Fragment neben dem 5500 bp großen Rest-Plasmid. Die entsprechenden E. coli-Klone zeigen Glucose-DH-Enzymaktivität. Eine weitere Verkleinerung des DNA-Fragmentes führt zu vollständigem Verlust der Enzymaktivität. Das Gen für die Glucose-Dehydrogenase ist also auf dem 1100 bp-Fragment lokalisiert.

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz des Glucose-DH-Gens erfolgt beispielsweise nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980, Methods Enzymol., 65, 499-580). Bei dieser Methode wird radioaktiv markierte DNA in vier verschiedenen basenspezifischen Reaktionen partiell gespalten, die Spaltprodukte werden auf einem denaturierten Polyacrylamidgel getrennt und die Sequenz nach anschließender Autoradiographie in an sich bekannter Weise ermittelt (Beispiel 7).

Die Sequenzierungsstrategie ist in Figur 5 abgebildet. Die dem Strukturgen zuzuordnende neue erfindungsgemäße Nukleotidsequenz ist in Figur 1 wiedergegeben.

Figur 2 zeigt die aus der DNS-Sequenz abgeleitete neue Aminosäuresequenz. Sie entspricht derjenigen, die durch Protein-Sequenzierung des aufgereinigten Enzyms erhalten wird.

Die Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids gemäß Figur 2 in einem E. coli-Wirt unter Benutzung des Plasmidvektors pJH111, aber ohne einen spezifischen E. coli-Promotor führt, wie oben angegeben, zu Enzymaktivitäten von durchschnittlich etwa 0,1 Units/ml Kultur. Um zu einer gewünschten Überproduktion zu kommen, wird ein Expressionsvektor benutzt. Als Expressionsvektor kommt beispielsweise pMR1 (Herkunft: Rimmier, 1985, Dissertation, TH Darmstadt) in Frage. Dieses Plasmid, welches aus den literaturbekannten Plasmiden pDS26t und pPlc28 konstruierbar ist, enthält den effizienten λ -P_L-Promotor. Das Plasmid pPlc28 sowie das zur Klonierung verwendete Wirtsbakterium E. coli W6 sind aus der europäischen Patentanmeldung EP 00 41 767 bekannt. In E. coli W6 ist der λ -P_L-Promotor durch den chromosomal codierten cl-Repressor reprimiert. pJH111 wird mit HindIII geschnitten und das erfindungsgemäße 1100 bp-Fragment wird nach präparativer Gelelektrophorese über "low melting" Agarose in an sich bekannter Weise isoliert. pMR1 wird ebenfalls mit vorzugsweise HindIII hydrolysiert und die Spaltprodukte werden in üblicher Weise ligiert und in E. coli W6 transformiert (Remaut et al., 1981, Gene 15, 81-93). Die Plasmid-DNA wird, wie angegeben (Beispiel 3) isoliert und ein beliebiger zur Transformation geeigneter, in einer anerkannten Hinterlegungsstelle erhältlicher E. coli-Stamm, in den in bekannter Weise das Plasmid pRK248 (Herkunft: Bernard et al. 1979, Gene 5, 59-76) einkloniert wurde, transformiert. Letzteres trägt das Gen für den temperatursensitiven λ -Repressor und für die Tetracyclinresistenz. Das neukonstruierte erfindungsgemäße Plasmid trägt die Bezeichnung pJH115. Seine Konstruktion ist in Figur 6 wiedergegeben. Der erfindungsgemäße Wirtsorganismus trägt die Bezeichnung E. coli N100/pRK248/pJH115. Erfindungsgemäß kann auf die Anwesenheit von pRK248 verzichtet werden, wenn Wirtsorganismen herangezogen werden können, bei denen der λ -Repressor chromosomal codiert wird (z.B. E. coli W6). Der erfindungsgemäße Wirtsorganismus zeigt die oben und in Figur 8 angegebenen überraschend hohen Expressionen. Ein typisches Expressionsexperiment ist in Beispiel 10 dargelegt.

Die Unterschiede der für Glucose-DH codierenden erfindungsgemäßen DNA-bzw. der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz im Vergleich zur bekannten Glucose-DH legen den Schluß nahe, daß neben dem neuen erfindungsgemäßen Enzym noch ein zweites Enzym bzw. Gen in Bacillus megaterium existiert. Die Identifizierung von Isoenzymen der Glucose-DH erfolgt durch Hybridisierung filtergebundener DNA aus Bacillus megaterium mit dem radioaktiv markierten 1126 bp HindIII-Fragment des Gens (Beispiele 7 und 8). Zu diesem Zweck wird in an sich bekannter Weise chromosomale DNA mit der Restriktionsendonuklease HindIII hydrolysiert, gemeinsam mit DNA-Längenstandards auf ein 1 % Agarosegel aufgebracht und auf Nitrozellulose übertragen. Als Längenstandard dient neben der durch Eco RI hydrolysierten SPP1 DNA ein Gemisch aus pJH108 (Sal I-Sph I hydrolysiert) und pJH111 (HindIII hydrolysiert), wodurch eine Größenbestimmung hybridisierender Fragmente nach der Autoradiographie ermöglicht wird. Hybridisierungstechnik und Autoradiographie sind, sofern nicht in den Beispielen näher erläutert, Stand der Technik bzw. für den

Fachmann in einfacher Weise daraus ableitbar. Aus dem Autoradiogramm (Figur 10), können neben der der eingesetzten Gensonde entsprechenden 1100 bp intensiven Bande schwächere Banden bei 2100 und 5000 bp identifiziert werden. Damit ist gezeigt, daß *Bacillus megaterium* mehr als eine Glucose-Dehydrogenase enthält.

- 5 Die Klonierung einer weiteren Glucose-DH entsprechend der Fragmente zwischen 1300 und 5000 bp kann prinzipiell wie oben für das 1100 bp-Fragment ausführlich beschrieben durchgeführt werden. Als Vektor dient das *E. coli*-Plasmid pUC18 (Herkunft: Viera et al., 1982, Gene 19, 259). Man erhält schließlich das neue Plasmid pJH211 (Figur 11) welches ein 2100 bp DNA-Fragment enthält und das in *E. coli* zur Expression von Glucose-DH führt (das gleichfalls mit der Gensonde hybridisierende 5000 bp-Fragment kann hierbei nicht erhalten werden). In an sich bekannter Weise, bzw. analog zum oben beschriebenen 10 1100 bp-Fragment wird die DNA-bzw. Proteinsequenz des zweiten Glucose-DH-Gens ermittelt. Sie entspricht dabei vollkommen der bekannten Sequenz der Glucose-DH. In Analogie zum Glucose-DH produzierenden, erfindungsgemäßen *E. coli*-Stamm *E. coli* N100/pRK248/pJH115 kann ein entsprechender Überproduktions-Stamm für die zweite Glucose-DH konstruiert werden: *E. coli* N100/pRK248/pJH215 liefert 15 erfindungsgemäß in großen Mengen qualitativ hochwertige Glucose-DH, wobei die Enzymaktivität ca. 20-30 % niedriger ist als im System *E. coli* N100/pRK248/pJH115. Die Stabilität beider Isoenzyme ist zwischen 20 und 50° (Vorinkubation) annähernd vergleichbar.

In der Beschreibung, in den Beispielen und Figuren werden, sofern dort nicht näher erläutert, folgende Abkürzungen verwendet:

- 20 A Adenin
A₅₇₈ Absorption bei 578 nm
A₅₇₈-E Absorptionseinheit bei 578 nm
Ap^R Ampicillinresistenz
25 APS Ammoniumperoxodisulfat
b Base
Bis N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid
bp Basenpaar
BSA Rinderserumalbumin
30 C Cytosin
Ci Curie (2,22 · 10¹² Zerfälle pro Minute)
cpm Zählpulse pro Minute
Da Dalton (g/mol)
DNA Desoxyribonukleinsäure
35 DTT Dithiothreitol
EDTA Ethyldiamintetraessigsäure
E. coli Escherichia coli
G Guanin
galK Galaktokinase
40 k x 10³
l Liter
NAD Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADP Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
PEG Polyethylenglykol
45 rpm Umdrehungen pro Minute
s Sekunde
SDS Natriumdodecylsulfat
T Thymin
T4 Bakteriophage T4
50 Tc^R Tetracyclinresistenz
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA Transfer-Ribonukleinsäure
U Einheit der Enzymaktivität (Unit)
55 Im folgenden sind die Abbildungen erläutert, in denen einzelne Teilbereiche der Erfindung dargestellt sind:

Figur 1: DNA-Sequenz des Glucosedehydrogenase-Gens aus *Bacillus megaterium*

Figur 2: Aminosäure-Sequenz des Expressionsproduktes von pJH111 bzw. pJH115.

Figur 3: Restriktionskarte des Plasmid-Vektors pJH107. Eingezeichnet sind die eindeutig zugeordneten Restriktionsschnittstellen. Die Größe der Passagier-DNA beträgt ca. 5800 bp. Das Plasmid pJH107 ist konstruiert aus dem BamHI-verdauten Plasmid pBR322 und der Sau3A-hydrolysierten Konstruktion aus chromosomaler DNA und λ -EMBL-3 Phagen-DNA.

Figur 4: Restriktionskarte des Plasmid-Vektors pJH108. Eingezeichnet sind nur die eindeutig zugeordneten Schnittstellen. Die Größe der Passagier-DNA beträgt ca. 3000 bp. Das Plasmid pJH108 ist konstruiert aus einem Fragment von pJH107 (SphI hydrolysiert) und pBR322.

Figur 5: Sequenzierungsstrategie des 1126 bp-Fragments aus pJH111. Die Pfeile geben die Größe der jeweils identifizierten Sequenz an. Das Plasmid pJH111 ist konstruiert aus dem HindIII-verdauten Fragment von pJH108 und pBR322.

Figur 6: Konstruktion des Plasmid-Vektors pJH115. Dieser ist konstruiert durch HindIII-Hydrolyse von pMR1 und pJH111 und anschließende Ligierung.

bla: Beta-Lactamase; gdh: Glucose-DH;

to: Terminator; galk: Galactokinase;

O_LP_L: Promotor-Operator-Region (λ -P_L-Promotor)

Ori: Replikationsursprung

Figur 7: Proteinsequenzvergleich zwischen Glucose-DH, basierend auf 1100 bp-Fragment (a), und Glucose-DH, basierend auf 2100 bp-Fragment (b; bekannte Sequenz). Dargestellt sind die ersten 45 Aminosäuren.

Figur 8: Wachstums- und Expressionskurve von E. coli N100/pRK248/pJH115. Bakterienwachstum in 20 ml LB-Medium (Beispiel 1) bei 28 °. Bei einer optischen Dichte von 0,5 A₅₇₈-E wurde die Kultur in ein 42 °-Wasserbad überführt, je 1 A₅₇₈-E Zellen entnommen und die Enzymaktivität bestimmt.

Figur 9: Überproduktion von Glucosedehydrogenase in E. coli N100/pRK248/pJH115. Proteintrennung auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel

Spur 1: Zellprotein vor der Induktion

Spur 2-8: 0,5; 1-5 und 10 h nach Induktion

Spur 9: Größenstandard

Figur 10: Autoradiogramm der Hybridisierung chromosomaler DNA aus Bacillus megaterium mit dem radioaktiv markierten 1100 bp-DNA-Fragment aus pJH111 bzw. pJH115 nach 12 h Exposition.

Spur 1: Chromosomale DNA (Bacillus meg.), HindIII-hydrolysiert

Spur 2: Chromosomale DNA (Bacillus meg.), unhydrolysiert

Spur 3: SPP1-Längenstandard

Spur 4: Gemisch aus je 10 ng: pJH108, SalI-hydrolysiert pJH108, SphI-hydrolysiert pJH111, HindIII-hydrolysiert

Figur 11: Restriktionskarte von pJH211. Nur die zur Restriktionsanalyse verwendeten Schnittstellen sind eingezeichnet. Das Plasmid pJH211 ist konstruiert aus pUC18 und HindIII-hydrolysiertem chromosomaler DNA.

Figur 12: Restriktionskarte von pJH215. Das Plasmid pJH215 ist konstruiert aus pJH211 (HindIII-hydrolysiert) und pMR1.

Bezeichnung wie in Fig. 6.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern. Die Temperaturen sind durchweg in Grad Celsius angegeben.

Beispiel 1 Anzucht von E. coli-Bakterien

a) Zur Präparation von Plasmiden in mg-Mengen erfolgt die Anzucht von E. coli-Bakterien im 1 l Maßstab in Voll-(LB) oder Minimalmedium (M9). Zu diesem Zweck wird 1 l Medium mit 5 ml einer stationären Vorkultur beimpft und unter ständigem Schütteln ca. 18 h bei 37 ° bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert.

b) Für die Überexpression der Glucose-Dehydrogenase wird 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer bei 28 ° gewachsenen Übernachtskultur beimpft. Die Bakteriensuspension wird daraufhin bei 28 ° und 160 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 A₅₇₈-E kultiviert. Im Anschluß wird das Kulturgefäß weitere 16 h bei 42 ° inkubiert.

a) LB-Medium:

a) LB-Medium:

- 5 Casein, enzymatisch hydrolysiert 10 g
 Hefeextrakt 5 g
 NaCl 5 g
 Agar (Festagar) 15 g
 (Weichagar) 7,5 g
 10 Aqua bidest. ad 1000 ml

pH-Wert mit 1,0 N NaOH auf 7,4 einstellen

- 15 Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: 50 µg/ml
 Tetracyclin: 20 µg/ml

20

b) Modifiziertes M9-Medium:

- M9-Salze 10-fach konzentriert 10 ml
 20 % Glucoselösung 5 ml
 1 M MgSO₄ 1 ml
 25 10 % Caseinhydrolysat 5 ml
 Thiaminlösung (2 mg/ml) 0,1 ml
 Aqua bidest. ad 1000 ml

- 30 c) M9-Salze 10-fach konzentriert:

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 75 g/l
 KH₂PO₄ 30 g/l
 NH₄Cl 10 g/l
 NaCl 5 g/l

35

Beispiel 2 Präparation von λ-Phagen

- 40 a) Plattenlysate

Um aus Phagensuspensionen mit niedrigem Titer eine größere Anzahl rekombinanter Phagen zu präparieren, werden zunächst Plattenlysate hergestellt.

- 45 Zu diesem Zweck werden 10⁵-10⁶ Phagen in einem Volumen von 100 µl mit 100 µl einer Übernachtskultur des Wirtstammes *E. coli* NM 539 versetzt und zur Phagenadsorption unbewegt bei 37° inkubiert. Im Anschluß werden 3 ml 47-50° heißer Weichagar zugegeben, gemischt und auf einer Festagarplatte verteilt. Nach 16stündiger Inkubation bei 37° wird die Weichagarschicht abgekratzt. Anschließend wird durch Zentrifugation (10 min) bei 10 000 rpm und 4° die Zelldebris abgetrennt. Der Überstand wird in ein steriles
 50 Gefäß überführt, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt und bei 4° aufbewahrt.

b) Flüssiglysate

55

Die Gewinnung von Phagen in präparativem Maßstab erfolgt mit Hilfe von Flüssiglysaten.

25 ml LB-Flüssigmedium, welches 10 mM MgSO₄ und 0,4 % Maltose enthält, wird mit einer Übernachtskultur des Wirtstammes *E. coli* NM 539 beimpft. Unter Belüftung wird die Suspension bis zum

- Erreichen von ca. $1,3 \text{ A}_{578}\text{-E}$ bei 37° inkubiert. Im Anschluß werden die Bakterien mit 10^6 Phagen/ml infiziert und zur Adsorption 15 min unbewegt bei 37° belassen. Mit den infizierten Bakterien wird daraufhin 1 l 37° warmes LB-Medium inokuliert und bis zum Eintreten der Lyse bei dieser Temperatur unter Belüftung inkubiert. Das Lyseereignis läßt sich durch einen rapiden Abfall der Extinktion bei 578 nm spektralphotometrisch verfolgen. Nach Entfernen der Zelldebris durch Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm und 4° können die Phagen im wäßrigen Überstand erhalten werden.

Beispiel 3 Isolierung von Vektor-DNA

10

a) Isolierung von Phagen-DNA

- Die Suspension von durch Ultrazentrifugation gereinigten Phagen wird auf 20 mM EDTA, 0,5 % SDS eingestellt und nach Zugabe von 50 µg/ml Proteinase K 1 h bei 50° inkubiert. Anschließend wird mehrfach mit gleichem Volumen Phenol und mehrfach mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wird mit Ethanol in bekannter Weise gefällt und durch Zentrifugation 10 min bei 5 000 rpm sedimentiert. Daraufhin wird sie mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Puffer aufgenommen.

20

b) Minipräparation von Plasmiden

- Um Plasmide in großer Zahl analysieren zu können, wird die Kurzlysatzmethode nach Birnboim (Birnboim und Doly, 1979: Nucl. acid Res. 7, 1513) verwendet.

- Je 1,5 ml Zellsuspension aus einer Übernachtskultur wird durch Zentrifugation 1 min bei 15 000 rpm sedimentiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung A (siehe unten) wird 5 min bei 20° inkubiert. Anschließend werden 200 µl Lösung B (siehe unten) zugegeben und die Gefäße werden in Eis gestellt. Nach weiteren 5 min wird Lösung C (siehe unten) zugegeben und die Proben werden solange in Eis belassen, bis ein unlöslicher Komplex aus chromosomaler DNA, RNA und Protein ausfällt (2-5 min). Nach einer Zentrifugation (15 min) werden die plasmidhaltigen Überstände in neue 1,5 ml-Eppendorf-Kunststoffgefäße überführt.

- Die DNA wird mit Ethanol 10 min bei -20° gefällt und 15 min in der Zentrifuge sedimentiert. Im Anschluß wird sie zweimal mit 70 % Ethanol gespült und (im Exsikkator) getrocknet.

- Nach Aufnahme in 40 µl TE-Puffer (siehe unten) kann sie direkt für die Transformation oder für Restriktionsanalysen eingesetzt werden:

Birnboim-Lösung A:

Birnboim-Lösung B:

- | | |
|------------------------|------------|
| 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 | 0,2 M NaOH |
| 50 mM Glucose | 1 % SDS |
| 10 mM EDTA | |

45

Birnboim-Lösung C:

TE-Puffer:

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 3 M NaOAc/HOAc, pH 4,8 | 10 mM Tris-Base |
| | 1 mM HCl |
| | pH: 8,0 |

55

c) Präparative Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmiden in mg-Mengen erfolgt mit Hilfe einer limitierten Protoplasten-Lyse durch Detergenzien (Hardies et al., 1979, J. Biol.Chem. 254 5527-5534).

Eine Bakteriensuspension nach Beispiel 1, wird 20 min bei 5 000 rpm und 4° zentrifugiert. Das Sediment wird in 15 ml Saccharoselösung (25 % Saccharose in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) aufgenommen. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 M EDTA und 3 ml Lysozymlösung (20 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) wird 30-40 min in Eis inkubiert. Danach werden 2 ml einer 2:1 (v/v) Mischung aus 10 % Polyethylenglycolmonolaurylether/10 % Desoxycholat zugegeben. Die Klärung des Zellaufschlusses erfolgt durch Zentrifugation (30 min) bei 40 000 rpm und 4°. Der klare Überstand wird dekantiert, 100 µg/ml RNase A zugegeben und 45 min in Eis inkubiert. Zur DNA-Fällung wird der RNase-behandelte Überstand mit einem halben Volumen 30 % PEG 6 000 in 1,5 M NaCl versetzt und weitere 30 min in Eis belassen. Man zentrifugiert 20 min bei 8 000 rpm und 4°. Der Niederschlag wird in 5 ml TE-Puffer aufgenommen, 50 µg/ml Proteinase K zugegeben und für 60 min bei 37° inkubiert. Danach wird mehrfach mit TE-gesättigtem Phenol und mehrfach mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA wird mit Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet. Das Sediment wird in 1-2 ml TE-Puffer gelöst und die Plasmidausbeute spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt.

20

Beispiel 4: Präparation chromosomaler DNA aus Glucose-DH-bildenden *Bacillus megaterium*-Zellen

Bakterienzellen aus 100 ml einer in Vollmedium gewachsenen stationären Kultur werden 10 min bei 5 000 rpm und 4° sedimentiert. Anschließend wird das Sediment in 10 ml Lysepuffer (50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl, pH 7.9) aufgenommen; 40 mg Lysozym werden zugegeben und 45 min bei 37° inkubiert. Die Suspension wird auf 1 % SDS eingestellt, mit 5 mg Proteinase K versetzt und weitere 30 min bei 37° belassen. Danach wird mehrfach mit TE-gesättigtem Phenol und mehrfach mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die Nukleinsäuren werden in üblicher Weise gefällt, gewaschen und getrocknet.

Zur Hydrolyse noch vorhandener RNA wird das Sediment vorsichtig in 5 ml TE-Puffer resuspendiert, 10 µg/ml RNase zugefügt und 30 min bei 37° inkubiert.

Die Lösung wird daraufhin auf 1 % SDS und 50 µg/ml Proteinase K eingestellt und weitere 30 min bei 37° behandelt. Anschließend wird wie oben beschrieben mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und gegen TE-Puffer dialysiert. Die Ausbeute an chromosomaler DNA beträgt bei dieser Methode zwischen 2 und 4 mg.

Beispiel 5: Ligierung von DNA

40

Die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen wird durch T4-DNA-Ligase katalysiert.

Die Reaktion erfolgt in T4-DNA-Ligasepuffer mit einem 5fachen Überschuß der zu inserierenden DNA gegenüber der Vektor-DNA. Das Volumen beträgt 20 µl.

Bei DNA-Fragmenten mit einzelsträngig überstehenden Enden wird die Ligierung 4-16 h bei 4° mit 1 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Die Ligierung von doppelsträngigen Enden erfolgt 4 h bei 20° mit 10 U Enzym pro µg DNA.

Anschließend wird das Reaktionsgemisch direkt für die Transformation eingesetzt (Beispiel 6).

50

T4-DNA-Ligasepuffer: 0,4 mM ATP
66 mM Tris-HCl, pH 7.8
6,6 mM MgCl₂
10 mM DTT

55

Beispiel 6: Transformation von *E. coli* (Calciumchlorid-Methode)

a) Herstellung kompetenter E. coli-Zellen

E. coli Zellen werden in 20 ml LB-Medium bis zum Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0.5 A_{578} -E kultiviert. Nach dem Überführen in ein vorgekühltes Zentrifugenröhrchen wird die Suspension 10 min in Eis gestellt. Die Bakterien werden 10 min bei 8 000 rpm und 4° sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes werden die Zellen mit 20 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung gewaschen und, wie beschrieben, zentrifugiert. Im Anschluß daran werden sie in 1 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und mindestens 2 h in Eis belassen.

b) Transformation kompetenter E. coli-Zellen

Zur Transformation werden 200 μ l kompetente Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min in Eis gestellt. Daraufhin wird der Ansatz 2 min im Wasserbad (42°) erhitzt (Hitzeimpuls). Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wird 1 h bei 37° inkubiert (Erholungsphase).

Je 200 μ l dieser Bakteriensuspension werden im Anschluß auf Selektivnährböden ausplattiert. Die Platten werden 16-24 h bei 37° bebrütet.

Für die Transformation des temperatursensitiven E. coli-Stammes N 100-pRK 248 clts werden alle Inkubationsschritte bei 28° durchgeführt. Der Hitzeimpuls erfolgt 5 min bei 34°.

Beispiel 7: Radioaktive Markierung von DNA

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente mit einer spezifischen Aktivität $> 10^8$ cpm/ μ g werden mit Hilfe der E. coli-DNA-Polymerase I durch Reparatursynthese ("nick translation") in Gegenwart von $\alpha^{32}P$ -Desoxynukleotiden dargestellt.

Ansatz:

0,2 μ g DNA
2 μ l 10 x DNA Polymerase-Puffer
Je 1 μ l 1,2 mM dNTPs (Nukleotide 1-3)
5 μ l $\alpha^{32}P$ -dNTP (3 000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) (Nukleotid 4)
0,5 μ l DNase I (60 pg/ μ l)
1 min bei 20° reagieren lassen und Zugabe von
10 U DNA Polymerase I

10 x DNA Polymerase-Puffer:

500 mM Tris-HCl, pH 7.8
50 mM $MgCl_2$
100 mM β -Mercaptoethanol
0,05 BSA

Die Reaktion erfolgt nach Zugabe von DNA-Polymerase I 2-4 h bei 14° und wird mit 20 μ l 60 mM EDTA, pH 8,0 gestoppt. Im Anschluß wird das Volumen mit H_2O auf 100 μ l erhöht.

Zur Entfernung von nicht umgesetzten Nukleotiden werden die Proben mit 100 μ l 5 M Ammoniumacetatlösung und 400 μ l absolutem Ethanol versetzt, gemischt und 2 min in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die radioaktiv markierten DNA-Fragmente werden daraufhin 15 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert, mit 70 % Ethanol gespült und getrocknet. Nicht umgesetzte Nukleotide bleiben im Überstand.

Die DNA wird in 100 μ l H_2O aufgenommen und in der Folge für Hybridisierungsexperimente verwendet.

Beispiel 8: Hybridisierung filtergebundener DNA

Die Hybridisierung filtergebundener DNA erfolgt in Lösungen mit 50 % Formamid. Zur Abdeckung
 5 unspezifischer Bindestellen werden die mit DNA-Fragmenten beschichteten Nitrozellulosefilter zusammen
 mit der sie bedeckenden Prähybridisierungslösung luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt und 3 h bei
 42° inkubiert.

10 Prähybridisierungslösung:

50 % Formamid
 5fach konzentrierte Denhardts Lösung
 5fach konzentriertes SSC (siehe unten)
 0,5 % SDS

15 100 µg/ml tRNA aus Hefe

Denhardts Lösung:

0,02 BSA
 20 0,02 Polyvinylpyrrolidon
 0,02 Ficoll (Polysucrose)

SSC:

25 150 mM NaCl
 mM Natriumcitrat, pH 7.2

Zur Hybridisierung wird zunächst die radioaktiv markierte, doppelsträngige DNA-Sonde durch 10
 30 minütiges Erhitzen auf 80° denaturiert und sofort in Eis abgekühlt.

Danach werden die nun einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren in 20-30 ml Hybridisierungslösung
 übergeführt. Mit dieser wird die Prähybridisierungslösung ersetzt und weitere 20 h bei 42° inkubiert.

Hybridisierungslösung:

35 50 % Formamid
 5fach konzentrierte Denhardts Lösung
 5fach konzentriertes SSC
 0,5 % SDS
 40 10 mM EDTA
 100 µg/ml tRNA aus Hefe
 10⁵ cpm/ml radioaktiv markierte DNA

Zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA werden die Filter nach der Hybridisierung zunächst
 mehrfach mit 200 ml 2fach konzentrierte SSC, 0,1 % SDS bei 20° und im Anschluß mehrfach mit 10
 45 %igem SSC, 0,1 % SDS bei 42° gewaschen.

Beispiel 9: Enzymtest für die Glucose-DH

50 Für diesen Test wird nicht-fluoreszierendes Chromatographiepapier mit 92 ml Indikatorlösung gleichmä-
 ßig besprüht und im Anschluß bei 20° getrocknet.

Indikatorlösung:

55 60,5 ml Natriumphosphat-Puffer (0,12 M; pH 7,6)
 30 ml D-Glucose-Lösung (10 % w/v)
 1,5 ml NAD⁺-Lösung (70 mg/ml)

Das präparierte Chromatographiepapier wird vor der Durchführung des Enzymtests auf die Größe der Nährbodenplatten zurechtgeschnitten (Durchmesser ca. 8 cm).

Zur Durchführung des Tests bei Phagenlysaten werden die Platten sofort nach Bildung gut sichtbarer Plaques (600-800 pro Platte) dem Brutschrank entnommen. Zunächst werden die Petrischalen markiert und identisch gekennzeichnete Testfilter deckungsgleich aufgelegt. Nach 2 min werden sie abgenommen, im Heißluftstrom getrocknet und im Anschluß unter Licht der Wellenlänge 366 nm betrachtet. Wurde aktive Glucose-DH auf die Test-Filter übertragen, so läßt sich an diesen Stellen NAD^+ zu NADH reduzieren, welches durch Fluoreszenz deutlich wahrgenommen werden kann. Mit Hilfe der Filtermarkierungen werden daraufhin positive Phagenklone auf der Nährbodenplatte identifiziert und isoliert.

Zur Durchführung des Tests bei Bakterienklonen werden Zellen in identischer Weise auf zwei Nährbodenplatten übertragen (100-200 Kolonien pro Platte). Während eine der Platten als Referenzplatte dient ("master plate"), wird die andere für den Enzymtest verwendet. Dabei werden die Bakterien auf Aluminiumfolie transferiert und ca. 5 μl der Aufschlußlösung auf jede Kolonie pipettiert. Zur Lyse werden die Zellen 30 min bei 20° in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird, wie oben beschrieben, ein Testfilter aufgelegt, getrocknet und die Stelle der enzymatischen Reaktion identifiziert. Die entsprechenden positiven Bakterien der Referenzplatte können im Anschluß zur Plasmidisolierung (Beispiel 3) verwendet werden.

Aufschlußlösung:

100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6.5
20 mM EDTA
mg/ml Lysozym

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt am Spektralphotometer bei 25°.

Testlösung:

120 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.6
100 mM Glucose
2 mM NAD^+

Die Angabe der Enzymaktivität (U/ml) erfolgt in μMol Substratumsatz pro min.

Beispiel 10: Präparation der in E. coli N 100/pRK 248/pJH 115 exprimierten Glucose-DH

Ein 10 l Laborfermenter wird mit 7,5 l LB-Medium beschickt, sterilisiert und im Anschluß mit 200 ml einer stationären Kultur des Überproduktionsstammes beimpft. Die Aufzucht der Zellen erfolgt bei 28° unter Belüftung. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0,5 $A_{578-\text{nm}}$ wird die Temperatur auf 42° erhöht und die Kultur weitere 5 h unter Belüftung inkubiert.

Zur Präparation der Glucose-DH werden die Bakterien (ca. 10 g Feuchtgewicht) sedimentiert und im Anschluß durch Zermörsem mit der gleichen Menge Aluminiumoxid bei 4° aufgeschlossen. Nach Zugabe von 12,5 ml P_{50} -Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 6,5; 0,1 mM 2-Mercaptoethanol; 2 μg Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid) und 50 μg DNase I wird 1 h bei 4° inkubiert. Die Entfernung des Aluminiumoxids erfolgt durch Zentrifugation bei 8 000 rpm und 4°. Der wässrige Überstand wird sodann durch Zentrifugation bei 15 000 rpm 30 min lang bei 4° geklärt.

Die Zellaufschlußlösung wird daraufhin mit 100 ml P_{50} -Puffer versetzt und auf eine DE-52-Säule aufgezogen. Nach Waschen mit 100 ml P_{50} Puffer werden Proteine mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0,05 auf 0,5 M KCl in P_{50} Puffer eluiert und in Fraktionen von 5 ml gesammelt. Das Elutionsvolumen beträgt 1 l. Zur Erstellung eines Elutionsprofils wird die Absorption bei 280 nm sowie die Glucose-DH-Aktivität in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

Die Ergebnisse der Proteinreinigung sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Reinigung der Glucose-DH

Reinigungs- stufe	Gesamt- aktivität (U)	Gesamt- Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)
Bakterien- aufschluß	52 800	1 130	46,7
Ammonium- sulfat- fällung	49 500	1 000	49,5
DE-52-Säule (Fraktion 58-68)	6 880	29,4	234

Zur Überprüfung der Homogenität des Enzyms werden Proben auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Glucose-Dehydrogenase durch Kultivierung eines mit rekombinanter DNA transformierten mikrobiellen Wirtsorganismus in einem Nährmedium und Isolation der zur Expression gebrachten Polypeptide, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirtsorganismus eingesetzt wird, der einen aus dem Genom von *Bacillus megaterium* isolierten DNA-Bereich enthält, welcher für Polypeptide mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase codiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Wirtsorganismus mit der DNA-Sequenz gemäß Anspruch 4 einsetzt.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als transformierter Wirtsorganismus *E. coli* eingesetzt wird.

4. Die DNA-Sequenz

5 ATG-TAT-ACA-GAT-TTA-AAA-GAT-AAA-GTA-GTT-GTA-ATT-
 ACA-GGT-GGA-TCA-ACA-GGT-TTA-GGA-CGC-GGA-ATG-GCT-
 GTT-CGT-TTC-GGT-CAA-GAA-GAA-GCA-AAA-GTT-GTT-ATT-
 AAC-TAT-TAC-AAC-AAT-GAA-GAA-GAA-GCT-CTA-GAT-GCG-
 AAA-AAA-GAA-GTA-GAA-GAA-GCA-GGC-GGA-CAA-GCA-ATC-
 10 ATC-GTT-CAA-GGC-GAT-GTA-ACA-AAA-GAA-GAA-GAC-GTT-
 GTA-AAT-CTT-GTT-CAA-ACA-GCT-ATT-AAA-GAA-TTT-GGT-
 ACA-TTA-GAC-GTA-ATG-ATT-AAC-AAC-GCT-GGT-GTT-GAA-
 AAC-CCA-GTT-CCT-TCT-CAT-GAG-CTA-TCT-CTA-GAT-AAC-
 15 TGG-AAC-AAA-GTT-ATT-GAT-ACA-AAC-TTA-ACA-GGT-GCA-
 TTC-TTA-GGA-AGC-CGT-GAA-GCA-ATT-AAA-TAC-TTC-GTT-
 GAA-AAC-GAC-ATT-AAA-GGA-AAT-GTT-ATC-AAC-ATG-TCT-
 20 AGC-GTT-CAC-GAA-ATG-ATT-CCT-TGG-CCA-TTA-TTT-GTT-
 CAC-TAC-GCA-GCA-AGT-AAA-GGC-GGT-ATG-AAA-CTA-ATG-
 ACG-GAA-ACA-TTG-GCT-CTT-GAA-TAT-GCG-CCA-AAA-GGT-
 25 ATT-CGC-GTA-AAT-AAT-ATT-GGA-CCA-GGT-GCG-ATG-AAC-
 ACA-CCA-ATT-AAC-GCA-GAG-AAA-TTT-GCA-GAT-CCA-GAA-
 CAA-CGT-GCA-GAC-GTA-GAA-AGC-ATG-ATT-CCA-ATG-GGT-
 30 TAC-ATC-GGT-AAA-CCA-GAA-GAA-GTA-GCA-GCA-GTT-GCA-
 GCA-TTC-TTA-GCT-TCA-TCA-CAA-GCA-AGC-TAT-GTA-ACA-
 GGT-ATT-ACA-TTA-TTT-GCA-GAT-GGC-GGT-ATG-ACG-AAA-
 TAC-CCT-TCT-TTC-CAA-GCA-GGA-AGA-GGC-TAA-TAG

- 35 die für eine Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase codiert.
5. DNA-Sequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus dem Genom eines Mikroorganismus, insbesondere *Bacillus megaterium*, stammt.
6. DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer DNA-Sequenz nach Anspruch 4 und 5 oder mit anderen für Glucose-Dehydrogenase codierenden DNA-Sequenzen hybridisiert oder mit besagten DNA-Sequenzen durch Mutation verwandt ist und für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase codiert.
7. DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es eine DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 4 bis 6 oder eine andere für Glucose-Dehydrogenase codierende DNA-Sequenz enthält, die funktionell mit mindestens einem Expressions-Kontroll-System gekoppelt ist.
- 45 8. DNA-Molekül nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressions-Kontroll-System eine Promotorsequenz von *E. coli* und/oder *Bacillus megaterium* enthält.
9. Plasmid, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 4 und ein *Bacillus megaterium* Promotor-System, mit der Bezeichnung pJH111 und der Hinterlegungsnummer DSM 4052P, und seine Mutanten.
10. Plasmid, enthaltend die DNA-Sequenz nach Anspruch 4 und ein *E. coli* Promotor-System, mit der Bezeichnung pJH115 und der Hinterlegungsnummer DSM 4051P, und seine Mutanten.
- 50 11. Transformierter Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein rekombinantes DNA-Molekül oder Plasmid nach einem der Ansprüche 7 bis 10 enthält.
12. Wirtsorganismus nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er *E. coli* ist.
13. Wirtsorganismus nach Anspruch 12, enthaltend das Plasmid pJH115 mit der Bezeichnung *E. coli* N100/pRK248/pJH115 und der Hinterlegungsnummer DSM 4047, und/oder Mutanten dieses Plasmids.
- 55 14. Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase und der Aminosäuresequenz

Met-Tyr-Thr-Asp-Leu-Lys-Asp-Lys-Val-Val-Val-Ile-
 Thr-Gly-Gly-Ser-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg-Ala-Met-Ala-
 6 Val-Arg-Phe-Gly-Gln-Glu-Glu-Ala-Lys-Val-Val-Ile-
 Asn-Tyr-Tyr-Asn-Asn-Glu-Glu-Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-
 Lys-Lys-Glu-Val-Glu-Glu-Ala-Gly-Gly-Gln-Ala-Ile-
 10 Ile-Val-Gln-Gly-Asp-Val-Thr-Lys-Glu-Glu-Asp-Val-
 Val-Asn-Leu-Val-Gln-Thr-Ala-Ile-Lys-Glu-Phe-Gly-
 Thr-Leu-Asp-Val-Met-Ile-Asn-Asn-Ala-Gly-Val-Glu-
 Asn-Pro-Val-Pro-Ser-His-Glu-Leu-Ser-Leu-Asp-Asn-
 15 Trp-Asn-Lys-Val-Ile-Asp-Thr-Asn-Leu-Thr-Gly-Ala-
 Phe-Leu-Gly-Ser-Arg-Glu-Ala-Ile-Lys-Tyr-Phe-Val-
 Glu-Asn-Asp-Ile-Lys-Gly-Asn-Val-Ile-Asn-Met-Ser-
 20 Ser-Val-His-Glu-Met-Ile-Pro-Trp-Pro-Leu-Phe-Val-
 His-Tyr-Ala-Ala-Ser-Lys-Gly-Gly-Met-Lys-Leu-Met-
 Thr-Glu-Thr-Leu-Ala-Leu-Gly-Tyr-Ala-Pro-Lys-Gly-
 25 Ile-Arg-Val-Asn-Asn-Ile-Gly-Pro-Gly-Ala-Met-Asn-
 Thr-Pro-Ile-Asn-Ala-Glu-Lys-Phe-Ala-Asp-Pro-Glu-
 Gln-Arg-Ala-Asp-Val-Glu-Ser-Met-Ile-Pro-Met-Gly-
 Tyr-Ile-Gly-Lys-Pro-Glu-Glu-Val-Ala-Ala-Val-Ala-
 30 Ala-Phe-Leu-Ala-Ser-Ser-Gln-Ala-Ser-Tyr-Val-Thr-
 Gly-Ile-Thr-Leu-Phe-Ala-Asp-Gly-Gly-Met-Thr-Lys-
 Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Ala-Gly-Arg-Gly

35 15. Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Enzyms Glucose-Dehydrogenase, dadurch gekenn-
 zeichnet, daß es von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 5 oder von einer DNA-Sequenz, die mit einer DNA-
 Sequenz nach Anspruch 6 hybridisiert oder durch Mutation verwandt ist, codiert worden ist.

16. Verwendung eines Polypeptides nach Anspruch 14 zur enzymatischen Glucosebestimmung.

FIG. 1

DNA-Sequenz des Glucosedehydrogenase-Gens
aus *Bacillus megaterium*

ATG-TAT-ACA-GAT-TTA-AAA-GAT-AAA-GTA-GTT-GTA-ATT-
ACA-GGT-GGA-TCA-ACA-GGT-TTA-GGA-CGC-GGA-ATG-GCT-
GTT-CGT-TTC-GGT-CAA-GAA-GAA-GCA-AAA-GTT-GTT-ATT-
AAC-TAT-TAC-AAC-AAT-GAA-GAA-GAA-GCT-CTA-GAT-GCG-
AAA-AAA-GAA-GTA-GAA-GAA-GCA-GGC-GGA-CAA-GCA-ATC-
ATC-GTT-CAA-GGC-GAT-GTA-ACA-AAA-GAA-GAA-GAC-GTT-
GTA-AAT-CTT-GTT-CAA-ACA-GCT-ATT-AAA-GAA-TTT-GGT-
ACA-TTA-GAC-GTA-ATG-ATT-AAC-AAC-GCT-GGT-GTT-GAA-
AAC-CCA-GTT-CCT-TCT-CAT-GAG-CTA-TCT-CTA-GAT-AAC-
TGG-AAC-AAA-GTT-ATT-GAT-ACA-AAC-TTA-ACA-GGT-GCA-
TTC-TTA-GGA-AGC-CGT-GAA-GCA-ATT-AAA-TAC-TTC-GTT-
GAA-AAC-GAC-ATT-AAA-GGA-AAT-GTT-ATC-AAC-ATG-TCT-
AGC-GTT-CAC-GAA-ATG-ATT-CCT-TGG-CCA-TTA-TTT-GTT-
CAC-TAC-GCA-GCA-AGT-AAA-GGC-GGT-ATG-AAA-CTA-ATG-
ACG-GAA-ACA-TTG-GCT-CTT-GAA-TAT-GCG-CCA-AAA-GGT-
ATT-CGC-GTA-AAT-AAT-ATT-GGA-CCA-GGT-GCG-ATG-AAC-
ACA-CCA-ATT-AAC-GCA-GAG-AAA-TTT-GCA-GAT-CCA-GAA-
CAA-CGT-GCA-GAC-GTA-GAA-AGC-ATG-ATT-CCA-ATG-GGT-
TAC-ATC-GGT-AAA-CCA-GAA-GAA-GTA-GCA-GCA-GTT-GCA-
GCA-TTC-TTA-GCT-TCA-TCA-CAA-GCA-AGC-TAT-GTA-ACA-
GGT-ATT-ACA-TTA-TTT-GCA-GAT-GGC-GGT-ATG-ACG-AAA-
TAC-CCT-TCT-TTC-CAA-GCA-GGA-AGA-GGC-TAA-TAG

FIG.2 Aminosäure - Sequenz des Expressionsproduktes
von pJH111 bzw. pJH115.

Met-Tyr-Thr-Asp-Leu-Lys-Asp-Lys-Val-Val-Val-Ile-
Thr-Gly-Gly-Ser-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg-Ala-Met-Ala-
Val-Arg-Phe-Gly-Gln-Glu-Glu-Ala-Lys-Val-Val-Ile-
Asn-Tyr-Tyr-Asn-Asn-Glu-Glu-Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-
Lys-Lys-Glu-Val-Glu-Glu-Ala-Gly-Gly-Gln-Ala-Ile-
Ile-Val-Gln-Gly-Asp-Val-Thr-Lys-Glu-Glu-Asp-Val-
Val-Asn-Leu-Val-Gln-Thr-Ala-Ile-Lys-Glu-Phe-Gly-
Thr-Leu-Asp-Val-Met-Ile-Asn-Asn-Ala-Gly-Val-Glu-
Asn-Pro-Val-Pro-Ser-His-Glu-Leu-Ser-Leu-Asp-Asn-
Trp-Asn-Lys-Val-Ile-Asp-Thr-Asn-Leu-Thr-Gly-Ala-
Phe-Leu-Gly-Ser-Arg-Glu-Ala-Ile-Lys-Tyr-Phe-Val-
Glu-Asn-Asp-Ile-Lys-Gly-Asn-Val-Ile-Asn-Met-Ser-
Ser-Val-His-Glu-Met-Ile-Pro-Trp-Pro-Leu-Phe-Val-
His-Tyr-Ala-Ala-Ser-Lys-Gly-Gly-Met-Lys-Leu-Met-
Thr-Glu-Thr-Leu-Ala-Leu-Gly-Tyr-Ala-Pro-Lys-Gly-
Ile-Arg-Val-Asn-Asn-Ile-Gly-Pro-Gly-Ala-Met-Asn-
Thr-Pro-Ile-Asn-Ala-Glu-Lys-Phe-Ala-Asp-Pro-Glu-
Gln-Arg-Ala-Asp-Val-Glu-Ser-Met-Ile-Pro-Met-Gly-
Tyr-Ile-Gly-Lys-Pro-Glu-Glu-Val-Ala-Ala-Val-Ala-
Ala-Phe-Leu-Ala-Ser-Ser-Gln-Ala-Ser-Tyr-Val-Thr-
Gly-Ile-Thr-Leu-Phe-Ala-Asp-Gly-Gly-Met-Thr-Lys-
Tyr-Pro-Ser-Phe-Gln-Ala-Gly-Arg-Gly

FIG.3

Restriktionskarte des Plasmid-Vektors
pJH107.

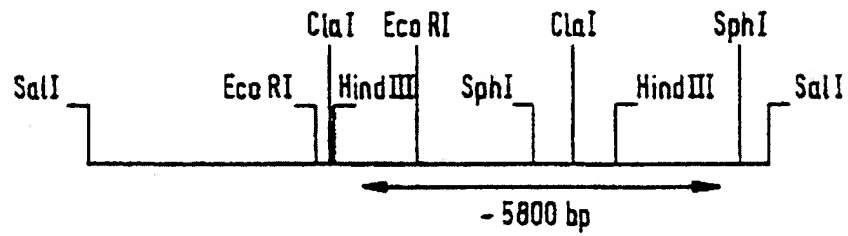


FIG.4

Restriktionskarte des Plasmid-Vektors
pJH108.

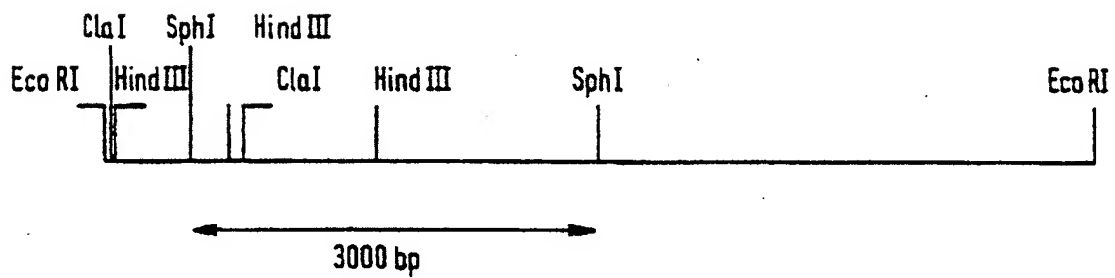


FIG.5 Sequenzierungsstrategie des 1126 bp-Fragments aus pJH111.

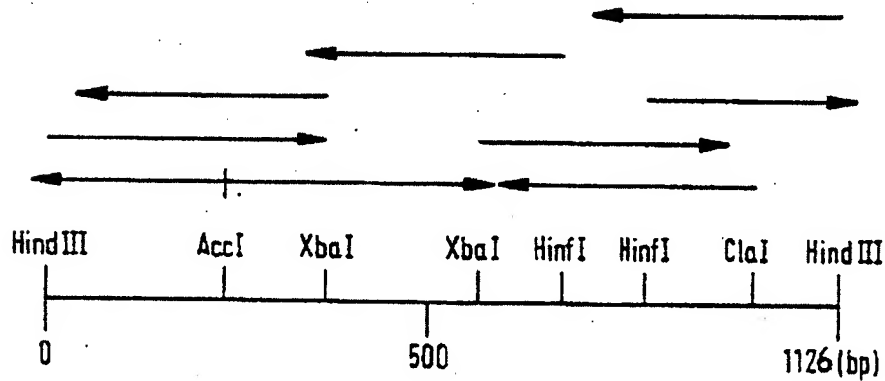


FIG.6 Konstruktion des Plasmid-Vektors pJH115.

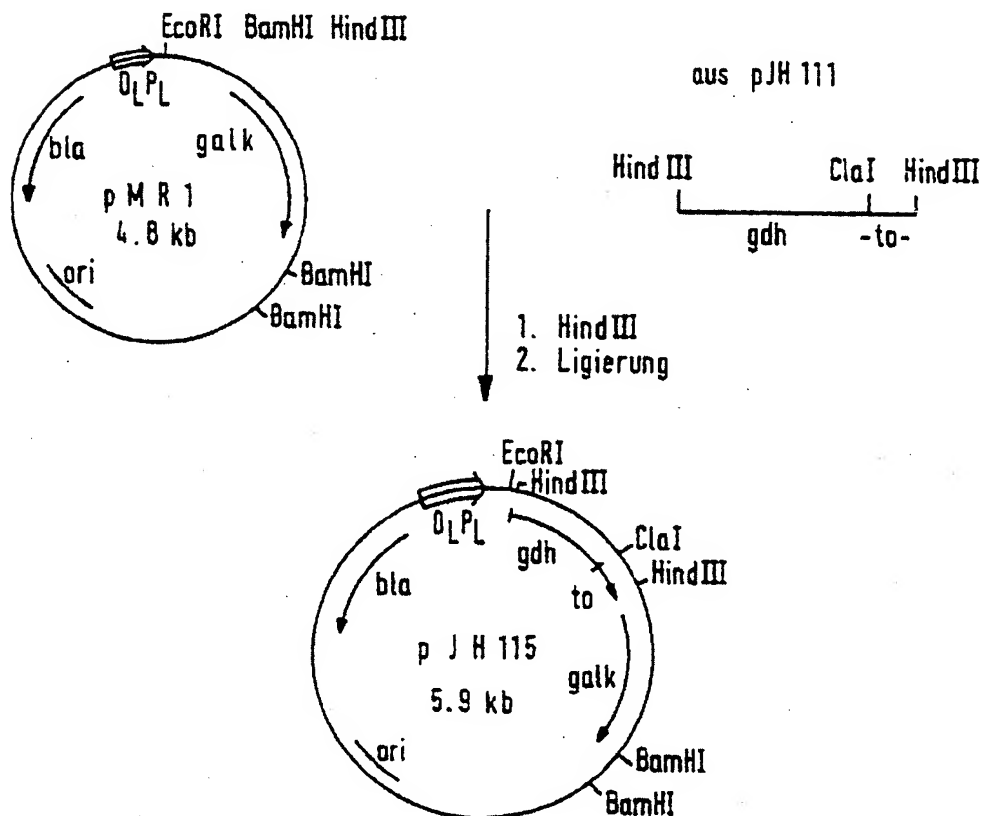


FIG.7

Proteinsequenzvergleich zwischen Glucose-DH,
basierend auf 1100 bp-Fragment (a), und
Glucose-DH, basierend auf 2100 bp-Fragment
(b; bekannte Sequenz).

a Met-Tyr-Thr-Asp-Leu-Lys-Asp-Lys-Val-Val-Val-Ile-
Thr-Gly-Gly-

b Met-Tyr-Lys-Asp-Leu-Glu-Gly-Lys-Val-Val-Val-Ile-
Thr-Gly-Ser-

a Ser-Thr-Gly-Leu-Gly-Arg-Ala-Met-Ala-Val-Arg-Phe-
Gly-Gln-Glu-

b Ser-Thr-Gly-Leu-Gly-Lys-Ser-Met-Ala-Ile-Arg-Phe-
Ala-Thr-Glu-

a Glu-Ala-Lys-Val-Val-Ile-Asn-Tyr-Tyr-Asn-Asn-Glu-
Glu-Glu-Ala-

b Lys-ala-Lys-Val-Val-Val-Asn-Tyr-Arg-Ser-Lys-Glu-
Asp-Glu-Ala-

FIG. 8

Wachstums- und Expressionskurve
von *E. coli* N100/pRK248/pJH115.

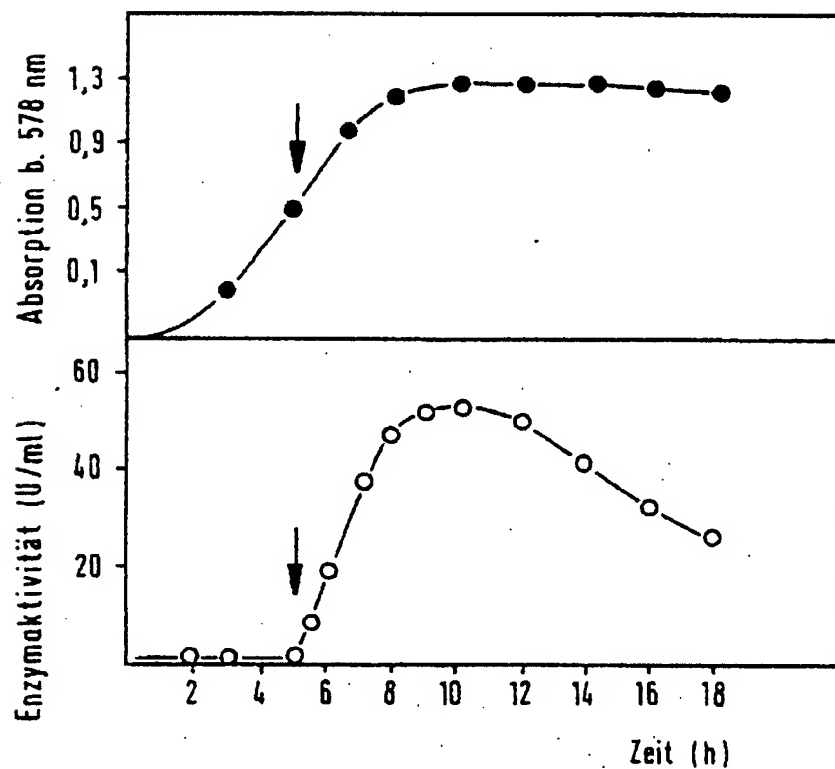


FIG. 9

Überproduktion von Glucosedehydrogenase
in *E. coli* N100/pRK248/pJH115.

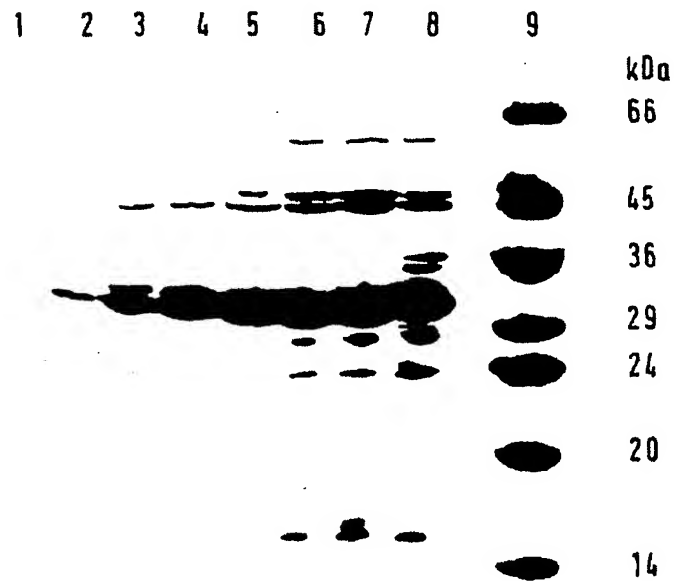


FIG. 10

Autoradiogramm der Hybridisierung chromo-
somer DNA aus *Bacillus megaterium* mit dem
radioaktiv markierten 1100 bp-DNA-Fragment
aus pJH111 bzw. pJH115 nach 12 h Exposition.

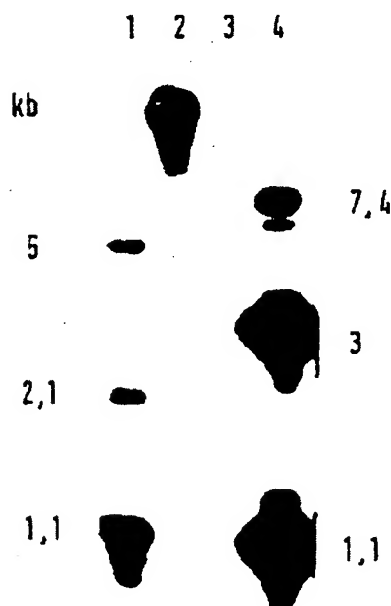


FIG.11 Restriktionskarte von pJH211.

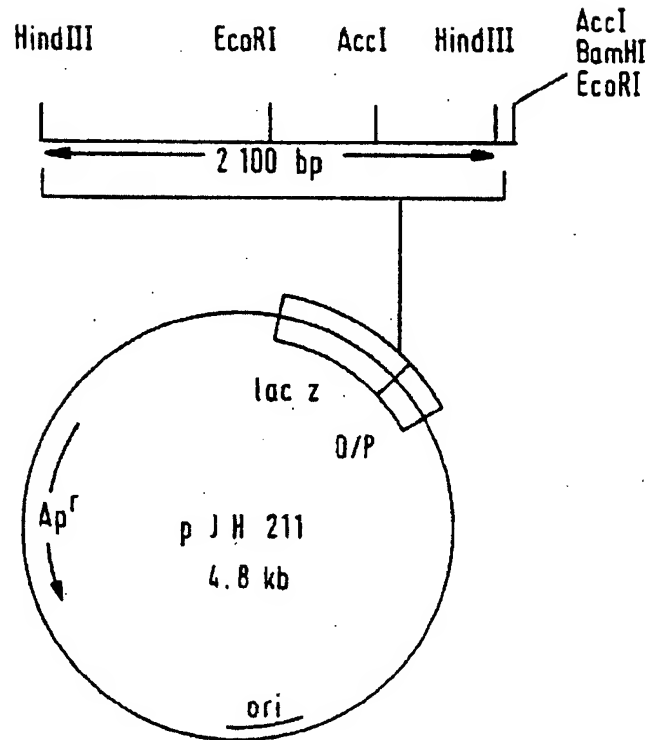


FIG.12 Restriktionskarte von pJH215.

